

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-139933

(43)公開日 平成11年(1999) 5月25日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
A 6 1 K 7/00	ADA	A 6 1 K 7/00	ADA J
			N
38/46	ADU	37/54	ADU

審査請求 有 請求項の数24 O L (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平10-244055

(22)出願日 平成10年(1998) 8月28日

(31)優先権主張番号 9 7 1 0 8 1 8

(32)優先日 1997年 8月29日

(33)優先権主張国 フランス (F R)

(71)出願人 391023932

ロレアル

LOREAL

フランス国パリ, リュ ロワイヤル 14

(72)発明者 ドミニク ベルナール

フランス国 75015 パリ, リュ ポー  
ル バリュエル, 48

(72)発明者 ミシエル ケルミシ

フランス国 75012 パリ, リュ ドゥ  
ビクピュス, 36

(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 表皮から単離されたポリペプチドとその用途

(57)【要約】

【課題】 角質細胞接合を減少させ、落屑を促進させるポリペプチドを提供し、またこれを含む組成物及び落屑を促進させる美容方法を提供する。

【解決手段】 15～32キロダルトンの見かけ分子量を有し、カテプシンL型のシステインプロテアーゼ族に属する、単離された天然または合成ポリペプチドを使用する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カテプシン L 型のシステインプロテアーゼ群に属し、15～32 キロダルトンの見かけ分子量を有する、単離された天然又は合成のポリペプチド。

【請求項 2】 6～9 の等電点を有することを特徴とする請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】 哺乳類から単離されたものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】 哺乳類の皮膚から単離されたものであることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】 ヒトの皮膚から単離されたものであることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド

【請求項 6】 ヒトの表皮から単離されたものであることを特徴とする請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】 角質細胞間接合を減少させる役割を担うものであることを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】 25～30 キロダルトンの見かけ分子量を有することを特徴とする請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 9】 活性が、pH 2～9、好ましくは 3.5～6.5 で最大であることを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】 請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを部分的に含むポリペプチド。

【請求項 11】 タンパク分解又は合成により得られた断片である請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】 生理学的に許容可能な媒体中に、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含有せしめてなる化粧品用又は製薬用の組成物。

【請求項 13】 ポリペプチドが、組成物の全重量に対して 0.00001%～50%、好ましくは 0.001%～10% の量であることを特徴とする請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】 少なくとも一つのプロテアーゼ活性剤をさらに含有することを特徴とする請求項 12 又は 13 に記載の組成物。

【請求項 15】 プロテアーゼ活性剤が、グリセロール、尿素及びその誘導体、トランスグルタミナーゼ、EDTA 及び還元剤から選択されることを特徴とする請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】 プロテアーゼ活性剤が、組成物の全重量に対して 0.00001%～15%、好ましくは 0.001%～10% の量であることを特徴とする請求項 14 又は 15 に記載の組成物。

【請求項 17】 処置される皮膚に、請求項 10 ないし

16 のいずれか 1 項に記載の化粧品用の組成物を適用することを特徴とする、過剰な角質細胞間接合に抗し、又は落屑を促進させるための美容処理方法。

【請求項 18】 落屑疾患の治療用の製薬組成物であることを特徴とする請求項 10 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 19】 角質増殖の治療用であることを特徴とする請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】 乾燥症、魚鱗癬、乾癬、良性又は悪性腫瘍障害又は反応性角化症の治療用であることを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載の組成物。

【請求項 21】 脱出症中における子宮頸部の白血球角化症、頬の白血球角化症、又はマルピーギ粘膜の角質化良性腫瘍障害の治療用であることを特徴とする請求項 18 又は 19 に記載の組成物。

【請求項 22】 前記単離ポリペプチド又は前記単離タンパク分解断片又は前記合成ペプチドに特異的に結合可能な分子の調製又は精製のための、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 23】 角質デスモソームに特異的な構造タンパク質の調製又は精製のための、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】 特異的モノクローナル抗体又は抗血清の調製又は精製のための、請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明の主題は、ある単離ポリペプチドと該単離ポリペプチドのタンパク分解由来のポリペプチド混合物とこれらを含む組成物並びに角質細胞間接合 (intercorneocyte cohesion) を減少させ、によって落屑を促進する美容処理方法にある。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】皮膚は体とその周囲との間の物理的障壁を構成している。皮膚は表皮と真皮の二つの組織からなる。真皮は表皮に対するしっかりした支持部となっている。真皮はまたフィダー成分でもある。真皮は、主として線維芽細胞と細胞外マトリックスとからなり、細胞外マトリックス自体は主にコラーゲンとエラスチンと基底物質と称される物質とから構成され、これら成分は主に線維芽細胞によって合成される。白血球、肥満細胞又は組織マクロファージ (tissue macrophage) もまたその内部に見出される。さらに、真皮には血管と神経線維も存在している。

【0003】表皮は平均 100 μm 厚の落屑性多層状上皮であり、通常、表皮胚芽層を構成するケラチノサイトの基底層と、胚芽細胞上に配された数層の多面細胞からなるいわゆる有棘細胞層と、はっきりした細胞質封入体、ケラトヒアリン顆粒を含む平坦細胞からなるいわゆる顆粒層と、最後に、角質細胞 (コルネオサイト: corn

ecytes)と呼ばれる分化の最終段階のケラチノサイトからなる角質層(horny layer又はstratum corneum)と称される最上層とに分けられる。これら角質細胞はケラチノサイト由来の無核で乾燥化した細胞である。角質細胞は、角質又は角質化膜(エンベロープ)と称される15nm厚の強い抵抗性を示す構造体で包囲され、サイトケラチンを含む線維マトリックスから主としてなる。これらの角質細胞が重なって、表皮の障壁機能を果たしている角質層を構成している。角質層は、水分喪失を調節することによって皮膚に対する生理的水分の補給を確実にし、選択的透過性を有している。さらに、角質層は、化学的なものであれ物理的なものであれ、環境からの攻撃に対する防御壁を構成している。角質層は次の2つの部位からなる:

—角質細胞が由来する顆粒細胞上部の柱状角質細胞積層体に、その細胞組織が相当する角化緻密層。各角質細胞は、上にある角質細胞と下にある角質細胞で最大に覆われている。

—緻密層より接合性が弱く角質細胞の落屑部位である、角質層の最終層からなる剥離層。

【0004】角質層において、角質細胞間空間は、層状体(ラメラ体)から派生した脂質シートで満たされている。表皮の分化は、継続的で方向付けられた成熟過程を表しており、基底層のケラチノサイトから、完全に角化して死亡した細胞である角質細胞が形成される。この分化は、一定厚を維持して表皮のホメオスタシスを確実に保つ完全に調和した現象の結果である。これは、分化過程に入る細胞の数と落屑細胞の数の調節を経て行われる。正常な落屑過程では、最も外側の角質細胞のみが表皮表面から剥離する。基底層から顆粒層への接合は、サイトケラチンの中間フィラメントとデスモソーム(接着斑)とにより形成される経細胞ネットワークによりなされている。このネットワークは半デスモソーム(半接着斑)により基底膜に固定されている。角質層における接合は、角質デスモソーム(corneodesmosomes)又は角質ソーム(corneosomes)と称されるデスモソーム由来の細胞間構造によりなされ、これにより角質細胞の角質膜が堅固に接続されている。表皮(非パルモプランター: non-palmpo-plantar)には、角質デスモソームが角質層下部の角質細胞全面に存在しているが、辺縁(periph- 40 1)角質デスモソームだけが上部に存在している。

【0005】角質デスモソームが角質細胞間接合並びに落屑過程において基本的に重要であることが近年の研究から明らかになった。特に、細胞解離とデスモグレインIのようなある種の角質デスモソーム成分のタンパク分解との間に密接な相関関係がある。落屑の研究により、表皮のいわゆる「死」層までの細密な生化学的調節が存在することを証明することができる。連続的かつ相補的に作用するのは、より深い生存層において産生される酵素であり、皮膚表面での角質細胞の最終的な放出に至

る。落屑に寄与していると思われる主な酵素が近年報告されている。これは、グリコシダーゼとプロテアーゼという二つの酵素群に属する。プロテアーゼは単独では作用することはできず、タンパク分解のグリコシダーゼ剥離部位の予備的な作用が必要であるようである。プロテアーゼは、おそらく落屑に最も関与しているタイプの酵素である。それらは4群:

- 活性部位にアスパラギン酸を有するアスパラギン酸プロテアーゼ、
- 10 —活性部位にセリンを有するセリンプロテアーゼ、
- 活性部位にシステインを有するシステインプロテアーゼ、
- 活性部位に非常にしばしば亜鉛原子、場合によってはカルシウム原子を有する金属プロテアーゼに細分される。

【0006】これらのプロテアーゼのなかで、リソソーム由来のシステインプロテアーゼ(カテプシンB、H及びL)が疑いなくヒト体内で最も活性のあるプロテアーゼである。このシステインプロテアーゼは個々のタンパク質の毎日の再生(70kgの個体当たり200~300g)に関与するものである。この点に関し、国際特許第95/07686号には、34~35キロダルトンの見かけ分子量のシステインプロテアーゼが記載されている。

【0007】皮膚の多数の病理学的症状は厚い角質層の生成と異常な落屑、すなわち角質増殖によって特徴付けられる。後者は、あらゆる解剖学的皮膚領域に多様な臨床状況で起こり得る。その生理病理学的実体及び原因は多様である。例えば:

- 30 —乾燥症(すなわち皮膚の乾燥)、
  - 魚鱗癬、
  - 乾癬、
  - ある種の良性又は悪性腫瘍障害
  - 反応性角化症、
- を挙げることができる。

【0008】他の病理学的症状は、通常は角質化されていないが、角質化され、すなわち、異常な上皮で被覆されて、その表面に角質層を形成する、粘膜、マルビーギ又は他のレベルでの分化転換又は化生により特徴付けられる。多くの場合、生殖器粘膜及び上部アエロ消化管が関与しているが、これら化生は種々の解剖学的領域に存在し得る。例としては:

- 40 —脱出症中における子宮頸部の白血球角化症(leukokeratosis)、
- 頬の白血球角化症、
- マルビーギ粘膜の角質化良性腫瘍障害、を挙げることができる。

【0009】本発明を如何なる理論に結びつけるものではないが、これらの病理学的症状は、特にプロテアーゼを含む、落屑に関与していると思われる酵素の質的又は

量的不足に関連していると考えることができる。

【0010】角質細胞間接合に関与する新しいポリペプチド、特にプロテアーゼの精製と知識は、主として皮膚表面又は粘膜表面における、ポリペプチド、特にプロテアーゼの過剰又は不足による影響に抗するための新規生成物の生産を可能にする一つの経路である。

【0011】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】よって、本発明の目的の一つは、角質細胞間接合に関与するポリペプチドを単離形態で提供することにある。

【0012】長期に渡って鋭意研究を行った結果、本出願人は、角質細胞間接合に関与するポリペプチドをヒトの表皮から生化学的技術により同定し、単離し、精製した。

【0013】よって、本発明の主題は、15～32キロダルトンの見かけ分子量と6～9の見かけ等電点を有する、カテプシンL型のシステインプロテアーゼ群に属する、単離ポリペプチドにある。

【0014】見かけ分子量とは、ポリアクリルアミド/硫酸ドデシルナトリウムゲル上の既知の分子量の標準タンパク質のものとその電気泳動移動度を比較することによって、又は排除クロマトグラフィーにおいて既知の分子量の標準タンパク質のものと溶出容量を比較することによって、ポリペプチドについて得られる分子量を意味するものと理解される〔ジェイ・シー・ジャンソン (J. C. Janson) 及びエル・ライデン (L. Ryden), 「タンパク質の精製 (Protein Purification)」(VCH出版社、ニューヨーク、1989年)に記載されている方法に従う〕。

【0015】見かけ等電点とは、ジェイ・シー・ジャンソン及びエル・ライデン, 「タンパク質の精製」(VCH出版社、ニューヨーク、1989年)に記載されているように、クロマトフォーカシング実験において既知の等電点の標準タンパク質に対して得られたものと比較してポリペプチドに対して得られた等電点を意味するものと理解される。

【0016】本発明のポリペプチドは天然由来でも合成由来であってもよい。ここでは、合成物とは、化学的に、又は産生に必要な成分を生物体に導入した後に該生物体中で産生させることによって得られる全てのポリペプチドを意味するものと理解される。

【0017】本発明のポリペプチドは、任意の可能な起源、すなわち動物、特に哺乳類、さらにはヒト由来、又は植物由来、又は微生物(とりわけ、ウイルス、ファージ又は細菌)由来、又は真菌由来のものであってよく、由来する生物体中に自然に存在しているかいないかについて予め判断する必要はない。

【0018】好ましくは、本発明のポリペプチドは天然由来のもので、哺乳類の組織、特に哺乳類の皮膚から単離される。

【0019】好ましくは、本発明のポリペプチドはヒトの皮膚、さらに好ましくはヒトの表皮から単離される。

【0020】上述したように、角質細胞間の接合は、とりわけ、角質細胞間結合(junction)に関連した構造に特異的なポリペプチドが角質層中に存在するために生じることとは明らかである。

【0021】したがって、本発明のポリペプチドは角質層に存在し、角質細胞間結合に関連した構造、特に角質デスモソームを破壊することにより角質細胞間接合を減少させる役割を担っている。

【0022】さらに、ポリペプチド、特にプロテアーゼを含む酵素は、それらの活性と融和性のある一次アミノ酸配列に対応する、いわゆる成熟形態で提供されうることとは知られている。しかし、これら成熟ポリペプチドは、より大きいポリペプチド、多くの場合、それらの一次アミノ酸配列に成熟ポリペプチドの一次配列を含む先駆物質から成熟現象によりしばしば派生することは知られている。同じことが本発明のポリペプチドについても言えるであろう。

【0023】したがって、本発明の主題は、一部が本発明のポリペプチドからなる任意のポリペプチドにもある。

【0024】さらに、ポリペプチドは、翻訳後に修飾を受けてもよく、例えばジスルフィド結合の形成、特定のタンパク分解による切断、炭水化物の添加(グリコシル化)、リン酸化で、特にセリン及び/又はスレオニン及び/又はチロシンのレベルでのもの、及び/又は脂質との組合せによるものを受けてもよいことも知られている。

【0025】よって、本発明は、より詳細には、翻訳後の修飾を受けた又は受けていない、本発明のポリペプチドに関する。

【0026】本発明のポリペプチドは、一又は複数の翻訳後の修飾を受けてよい。

【0027】好ましくは、本発明のポリペプチドはグリコシル化及び/又はリン酸化される。

【0028】本発明のポリペプチドは、15～32キロダルトン、好ましくは25～30キロダルトンの見かけの分子量を有する。

【0029】一般に酵素、特にプロテアーゼは、決ったpHを有する媒体で最大の活性を示すことがよく知られている。

【0030】したがって、本発明のポリペプチドは、その活性がpH2～9、好ましくは3.5～6.5で最大になることを特徴とする。例えば、カゼインにおけるポリペプチドの最大活性は、pH4.6～5.6においてである。

【0031】ポリペプチドの一次アミノ酸配列がプロテアーゼにより特異的に認識される部位を決定し、ひとたびこれらの部位が認識されると、プロテアーゼが該ポリ

ペプチドに付着あるいは付着しないで、タンパク分解によるその切断を誘発する。

【0032】したがって、本発明は、本発明のポリペプチドの少なくとも1つのタンパク分解断片にも関する。

【0033】以下、特にそれ以外の説明を記載しない場合は、ポリペプチドとは、タンパク分解により得られようが、合成により得られようが、本発明の天然又は合成ポリペプチドもしくはその断片の少なくとも一つを意味するものと理解される。

【0034】角質細胞間接合は、角質細胞間結合に関連した構造に特異的なポリペプチドが角質層に存在するために生じることは明らかである。ある種の角質増殖病は、過度の角質細胞間接合に関係していることが知見されている。

【0035】本出願人は、本発明のポリペプチドが、角質細胞間結合、従って角質細胞間接合に関連した構造を破壊する現象に関与していることを示すことができた。よって、本発明のポリペプチドは、角質細胞間接合の減少、ひいては落屑の促進のための化粧品又は製薬用組成物に使用することができる。

【0036】よって、本発明の他の主題は、生理学的に許容可能な媒体中に、少なくとも一つの上述したポリペプチドを含有せしめてなる化粧品又は製薬用組成物を提供することにある。

【0037】好ましくは、本発明の組成物は皮膚又は粘膜に適用される。

【0038】また本発明は、落屑に関する疾患、例えば角質増殖、例えば、乾燥症（すなわち皮膚の乾燥）、魚鱗癬、乾癬、ある種の良性又は悪性腫瘍障害による角質増殖、及び反応性角化症を治療するための、少なくとも一つの本発明のポリペプチドを含有する製薬用組成物に関する。

【0039】さらに本発明は、通常は角質化されていないが、角質化される粘膜、マルピーギ又は他のレベルでの分化転換又は化生により特徴付けられる病理学的症状、例えば脱出症中における子宮頸部の白血球角化症、頬の白血球角化症、マルピーギ粘膜の角質化良性又は悪性腫瘍障害を治療するための、少なくとも一つの本発明のポリペプチドを含有する製薬用組成物に関する。

【0040】本発明の組成物に含まれるポリペプチドの量は、所望する効果にもちろん依存し、広範囲に変わらう。

【0041】量の目安を述べると、組成物は、その全重量に対して0.00001%~50%、好ましくは0.001%~10%、さらに好ましくは0.1%~1%で表される量で本発明のポリペプチドを含有する。

【0042】従来技術において、ある種の化合物がプロテアーゼ活性化物質として開示されている。乾燥症に対するグリセロールの有益な効果が例えば知られており、その効果は、角質デスモソームを破壊し、故に落屑を生

じさせるプロテアーゼの作用を促進と思われるその水和作用による、酵素系への活性化効果として説明されている（国際特許出願第95/07687号）。

【0043】また、尿素及びその誘導体も、非常に乾燥して、魚鱗癬でさえある皮膚の表面状態を改善することが昔から知られている〔スワンベック（Swanbeck）、

「皮膚病学と性病学（Acta Dermatologica and Venereologica）」、1968年、第48巻、123-127頁〕。ウィデランダーズ（Wiederanders）ら〔「生物医学、生化学（Biomedical Biochemistry Acta）」、1986年、第45巻、（11-12）、1477-1483頁〕は、魚から抽出されたカテプシンが尿素の存在下でより活性化することを明らかにした。しかし、著者らは、その活性が尿素の存在下で、それぞれ2.5倍及び6倍になるカテプシンL及びDを特異的に分析することに成功している。

【0044】また、プロテアーゼ活性剤として還元剤も開示されている。例えば、硫化物、チオール類、例えばジチオトレイトール又はトリチオヘキシトール、システイン、N-アセチルシステイン、システインに富むタンパク質又はタンパク質加水分解物、メルカプトエタノール、チオグリセロール、チオアルカン酸及びメルカプトカルボン酸及びそれらの類似物、例えばメルカプトコハク酸、チオ乳酸、チオグリコール酸及びそれらの塩、補酵素A又は還元グルタチオン（GSH）を挙げることができる。これらの還元剤は、活性形態又はそれらの先駆物質、例えばシステインの先駆物質であるオキシチアゾリジン-カルボキシラートのような形態で組成物中に存在し得る。

【0045】エチレンジアミンテトラアセテート（EDTA）は、特にカテプシン型のプロテアーゼの重金属による不活性化を防止することが知られている。このように、EDTAはプロテアーゼ活性剤と考えられている。

【0046】また、プロテアーゼ活性剤とトランスグルタミナーゼを同化させることも可能である。これらの酵素はトランスペプチダーゼ種に属する。それらはカルシウム依存性であり、グルタミン残基の（ $\gamma$ 炭素上の）カルボキシル基とポリアミン又はリシン残基のアミノ基とを反応させることによる、 $\epsilon$ （ $\gamma$ -グルタミル）リシンのイソペプチド架橋の形成を触媒する。トランスグルタミナーゼは、分子量が70 kDの先駆物質を有する50-56 kDのサイトゾル（又は表皮性）トランスグルタミナーゼEと、メンブレントランスグルタミナーゼKすなわち分子量が92 kDのタイプIの二つの主な形態で表皮中に存在している。トランスグルタミナーゼE及びKは、非常に多くのタンパク質を互いに架橋することによる角質膜の形成に共に関与しており、そのタンパク質の主なもの、インボルクリン（involucrine）、ロリクリン（loricrine）、エラフィン（elafine）、シスタチン、パンコルヌリン（pancornulines）〔すなわちS

PR:スモール・プロリン・リッチ (Small Proline Rich)、サイトケラチン、デスモブラキン (desmoplakins) I 及び II、デスモグレイン及び角質デスモシン

(corneodesmosine) である。シスタチンは、システインプロテアーゼ阻害活性を有するタンパク質である [タカハシら, FEBSレター (1990年, 第2巻, 261-264頁)]。したがって、トランスグルタミナーゼ活性剤の供給又はトランスグルタミナーゼの直接供給により、トランスグルタミナーゼ活性が増大すると、角質膜の構成タンパク質の量が増加し、そのタンパク質がトランスグルタミナーゼの影響下で該膜の形成に捕捉される。この場合、角化層は、シスタチンを特に含んでいるその内在性タンパク質が奪われる。ついで、表皮、特に角化層からシスタチンが消失すると、その活性が増加したシステインプロテアーゼの放出の効果が現れ、角質細胞間接合が減少し、よって落屑が促進される。したがって、本発明の主題は、少なくとも一つの本発明のポリペプチドと、少なくとも一つのプロテアーゼ活性剤をさらに含有する化粧品又は製薬用組成物にある。

【0047】プロテアーゼ活性剤としては、グリセロール、尿素、EDTA、トランスグルタミナーゼ及び還元剤を挙げることができる。

【0048】もちろん、本発明の組成物に含有されるプロテアーゼ活性剤の量は、所望する効果に依存し、大きく変わらう。

【0049】目安を述べると、組成物は、その全重量に対して0.00001%~15%、好ましくは0.001%~10%で表される量でプロテアーゼ活性剤を含有する。

【0050】組成物中において、プロテアーゼ活性剤は単独でも混合物の形態であってもよい。

【0051】その性質が何であれ、本発明の組成物は、摂取され、注射され、又は皮膚 (体の任意の皮膚領域) もしくは粘膜 (頬、頬骨、歯肉、生殖、結膜等) へ塗布することができる。

【0052】投与方法に応じて、本発明の組成物は、通常使用される任意のガレノス形態 (galenical forms) で提供され得る。

【0053】皮膚への局所適用用には、組成物は、特に、水性又は油性の溶液、又は漿液型又はローションの分散液、水性相に脂肪相を分散 (O/W) して、又はその逆 (W/O) によって得られる、液状又は半液状のコンシステンシーのミルク型のエマルジョン、又は軟性のコンシステンシーの水性又は無水のクリーム又はゲル型のエマルジョン又は懸濁液、又はイオン性及び/又は非イオン性の小胞分散液の形態、もしくは加圧された噴霧剤をさらに含有するエアゾール組成物の形態とすることができる。これらの組成物は通常の方法で調製される。

【0054】注射用には、組成物は、水性又は油性のローションの形態又は漿液の形態で提供することができ

る。眼用には点滴薬の形態、摂取用には、カプセル、顆粒、シロップ又は錠剤の形態で提供することができる。

【0055】本発明の組成物の種々の成分の量は、考慮される分野で、従来より使用されている量である。

【0056】これらの組成物は、特に、顔、手、足、大きな解剖学上のヒダ又はボディのクレンジング、保護、トリートメント又は手入れ用のクリーム (例えば、デイクリーム、ナイトクリーム、メークアップ除去用クリーム、ファンデーションクリーム、抗日光用クリーム)、液状ファンデーション、メークアップ除去用ミルク、ボディ保護又は手入れ用ミルク、抗日光用ミルク、日焼け後用ミルク (after-sun milk)、スキンケア用ローション、ゲル又はムース、例えばクレンジングローション、抗日光用ローション、日焼け後用ローション、人工的な日焼け用ローション、入浴用組成物 (bath composition)、殺菌剤を含有する脱臭用組成物、アフターシェービングゲル又はローション、脱毛クリーム、昆虫忌避用組成物、鎮痛用 (antipain) 組成物又はある種の皮膚病、例えば湿疹、しゅさ、乾癬、苔癬、激しい痒み及び魚鱗癬の治療用の組成物を構成することができる。

【0057】さらに、本発明の組成物は、クレンジングソープ又はケーキを構成する固体状の調製物からなるものであってもよい。

【0058】また、組成物は、加圧された噴霧剤をさらに含有するエアゾール組成物の形態に包装されてもよい。

【0059】またさらに、本発明の組成物は、頭皮の手入れ用組成物、特にシャンプー、ヘアセット用ローション、トリートメントローション、スタイリングクリーム又はゲル、染毛シャンプーの形態であってもよい染色 (特に酸化染色用) 組成物、髪の新構成用ローション、パーマメントウェーブ用組成物 (特に、パーマメントウェーブ施術の第1工程用の組成物)、抜毛防止用のゲル又はローション、駆虫用シャンプー、抗フケ用組成物等にすることもできる。

【0060】また、本発明の組成物は、頬歯 (dentibuccal) 用、例えば、練り歯磨きに使用することもできる。この場合、組成物は、頬用の組成物に一般的なアジュバントと添加剤、特に、界面活性剤、増粘剤、保湿剤、研磨剤、例えばシリカ、種々の活性成分、例えばフッ化物、特にフッ化ナトリウム、及び任意の甘味料、例えばサッカリンナトリウムを含有してもよい。

【0061】本発明の組成物がエマルジョンである場合、脂肪相の割合は、組成物の全重量に対して5~80重量%、好ましくは5~50重量%である。エマルジョンの形態の組成物に使用される油、ロウ、乳化剤及び共乳化剤は、化粧品の分野で従来より使用されているものから選択される。乳化剤及び共乳化剤は、組成物中に、組成物の全重量に対して0.3~30重量%、好ましくは0.5~20重量%の範囲の割合で存在する。エマル

ションは、脂質小胞体をさらに含有していてもよい。

【0062】組成物が油性ゲル又は溶液である場合、脂肪相は組成物の全重量に対して90%より多くしてもよい。

【0063】また、公知の方法に従って、化粧品用組成物は、化粧品の分野で一般的なアジュバント、例えば、親水性又は親油性のゲル化剤、親水性又は親油性の添加剤、防腐剤、酸化防止剤、溶媒、香料、フィラー、遮蔽剤、臭気吸収剤及び着色物質を含有してもよい。これら種々のアジュバントの量は、化粧品の分野において従来より使用されている量、例えば、組成物の全重量に対して0.01~10%である。これらのアジュバントは、その性質により、脂肪相、水性相及び／又は脂質小胞体に取り込まれ得る。

【0064】本発明で使用可能な油又はロウとしては、鉱物性油（ペトロラタム）、植物性油（シェアバター、液状留分、ヒマワリ油）、動物性油（ベルヒドロスクワレン）、合成油（プルセリン油：Purcellin oil）、シリコン油又はロウ（シクロメチコン）及びフッ化油（ペルフルオロポリエーテル）、ミツロウ、カルナウバ又はパラフィンロウを挙げることができる。脂肪アルコールと脂肪酸（ステアリン酸）をこれらの油に添加してもよい。

【0065】本発明で使用可能な乳化剤としては、例えば、ステアリン酸グリセリル、ポリソルベイト（polyso rbate）60及びガッテフォセ（Gattefosse）社からテフォース（Tefose）63（登録商標）の名称で販売されているPEG-6/PEG-32/ステアリン酸グリコールの混合物を挙げることができる。

【0066】本発明で使用可能な溶媒としては、低級アルコール、特に、エタノール及びイソプロパノール及びプロピレングリコールを挙げることができる。

【0067】本発明で使用可能な親水性のゲル化剤としては、カルボキシビニルポリマー類（カーボマー：carbomer）、アクリルコポリマー類、例えば、アクリレート／アルキルアクリレートのコポリマー類、ポリアクリルアミド類、多糖類、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、天然ガム類及びクレイ類を挙げることができ、また、親油性のゲル化剤としては、変性クレイ類、例えば、ベントーン類、脂肪酸の金属塩、例えば、ステアリン酸アルミニウム、疎水性シリカ、エチルセルロース、ポリエチレンを挙げることができる。

【0068】組成物は、他の親水性の活性剤、例えば、タンパク質又はタンパク質の加水分解物、アミノ酸、多価アルコール、尿素、アラントイン、糖類及び糖類誘導体、水溶性ビタミン類、植物エキス及びヒドロキシ酸を含有してもよい。

【0069】親油性の活性剤としては、レチノール（ビタミンA）及びその誘導体、トコフェロール（ビタミンE）及びその誘導体、必須脂肪酸、セラミド類、精油、

サリチル酸及びその誘導体を使用することができる。

【0070】本発明の組成物においては、特に皮膚病の治療及び／又は防止を意図した他の活性剤と、少なくとも1つのアヤメ科の少なくとも1つの抽出物とを組み合わせてもよい。このような活性剤としては、例えば：

－分化及び／又は増殖及び／又は色素沈着を減少させる薬剤、例えば、レチノイン酸及びその異性体、レチノール及びそのエステル類、ビタミンD及びその誘導体、エストロゲン類、例えば、エストラジオール、コウジ酸又はヒドロキノン；

－抗菌剤、例えば、リン酸クリンダマイシン、エリスロマイシン又はテトラサイクリン類の抗生物質；

－駆虫剤、特に、メトロニダゾール、クロタミトン又はビレスロイド類；

－抗真菌剤、特に、イミダゾール類に属する化合物、例えば、エコナゾール、ケトコナゾール又はミコナゾール、又はそれらの塩類、ポリエン化合物、例えば、アンホテリシンB、アリルアミン類の化合物、例えばテルビナフィン、又はオクトピロックス（octopirox）；

－抗ウィルス剤、例えばアシクロビル；

－ステロイド系の抗炎症剤、例えば、ヒドロコルチゾン、吉草酸ベタメタゾン、又はプロピオン酸クロベタゾール、又は非ステロイド系の抗炎症剤、例えば、イブプロフェン及びその塩類、ジクロフェナク及びその塩類、アセチルサリチル酸、アセトアミノフェン、又はグルシルリジン酸；

－麻酔剤、例えば、塩酸リドカイン及びその誘導体；

－止痒剤、例えば、テナルジン、トリメブラジン又はシブロヘプタジン；

－角質溶解剤、例えば、 $\alpha$ -及び $\beta$ -ヒドロキシカルボン酸、又は $\beta$ -ケトカルボン酸、及びそれらの塩類、アミド類又はエステル類、特に、ヒドロキシ酸、例えば、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、クエン酸、及び一般には果実の酸類及び5-n-オクタノイルサリチル酸；

－保湿剤、例えばグリセロール及びその誘導体；

－抗フリーラジカル剤、例えば、 $\alpha$ -トコフェロール又はそのエステル類、スーパーオキシドジスムターゼ、ある種の金属キレート剤又はアスコルビン酸及びそのエステル類；

－抗脂漏剤、例えば、プロゲステロン；

－抗フケ剤、例えば、オクトピロックス又はジンクピリチオン；

－抗ざ瘡剤、例えば、レチノイン酸又は過酸化ベンゾイル；

－植物又は細菌由来のエキスを挙げることができる。

【0071】したがって、特定の実施態様において、本発明の組成物は、抗菌剤、駆虫剤、抗真菌剤、抗ウィルス剤、抗炎症剤、止痒剤、麻酔剤、角質溶解剤、抗フリーラジカル剤、抗脂漏剤、抗フケ剤及び抗ざ瘡剤、及び／又は皮膚の分化及び／又は増殖及び／又は色素沈着を

低減させる薬剤から選択される少なくとも1つの薬剤をさらに含有する。

【0072】本発明の他の目的は、過剰な角質細胞間接合に抗し、よって落屑を増大させる美容処理方法を提供するものであり、該方法は、少なくとも1つの本発明のポリペプチドを含有する化粧品用組成物を皮膚に適用することからなる。

【0073】また本発明の主題は、前記単離されたポリペプチド又は前記単離されたタンパク分解断片又は前記合成ペプチドに特異的に結合可能な任意の構造又は機能分子を、必要に応じて表皮から、調製又は精製するために、本発明のポリペプチドを使用することにある。この分子は、「プロテアーゼ」、「グリコシダーゼ」又は「ホスファターゼ」型で、角質層の種々の酵素及び角質デスモソームに特異的な他の構造タンパク質に相当し得るものである。

【0074】さらに本発明の主題は、特にそのタンパク質及びその断片の精製を目的とした特異的なモノクローナル抗体及び抗血清を調製するために、本発明のポリペプチドを使用することにある。拡大すると、本発明の主題は、その産生に使用する生物学的系にかかわらず、組換え抗体又は抗体断片を産生するために、前記ポリペプチドを使用することにある。

【0075】

【実施例】ポリペプチドの単離と特性化：角化層タンパク質を、いわゆる「擦過（スクレイピング）」法により集めた。この方法は有機溶媒による抽出段階を必要とせず、よって酵素活性の破壊をより少なくしうる。また、かなりの量の物質を得ることが可能である。擦過は脚の前部表面について行った。サンプル収集の領域を、pH 7で50 mMのリン酸ナトリウムバッファー、5 mMのEDTA、150 mMのNaCl及び0.1%のトリトン（Triton）X100からなる200 mlのバッファーを、ポンプによって100 ml/minの一定流量で分配付与して洗浄した。ついでその領域の表面を、顕微鏡用のスライドガラスの縁部でこすった。細胞を含有する液体を脚の下に配された容器に集めた。このようにして捕集されたバッファーを、再利用して多数回行った（15）。ついでサンプルを実験の種類に応じて一緒に又は別にグループ化した。このようにして得られた溶液を、まずワットマン第4号濾紙、ついでミリポア0.45 µmフィルター、最後に0.22 µmミリポアフィルターで濾過した。この浄化された溶液を、K. BL（商標）装置及びサートコン（Sartocon）（商標）膜 [サートリウス（SARTORIUS）社] により、濾過出口流量が2 ml/min、1バールの逆圧を有し、4℃で10 kDのカットオフがなされるタンジェンシャル限外濾過で12 mlまで濃縮した。健康な皮膚を持つ個体に対して、この方法で抽出されたタンパク質の濃度は、15回の繰返しで最終的に12 ml当たり0.15 mg/mlのオーダー

にした。

【0076】タンパク質の分離：スーパーデックス（Superdex）G200HR10/30（商標）カラム [ファーマシア・バイオテック社（Pharmacia Biotech）] を600 kD～10 kDの範囲の分解能でタンパク質の分離のために使用した。この技術は、分子量の関数としての分離に基づくが、タンパク質の最初の推定分子量を求めることができる。得られたクロマトグラフィープロフィールには、タンパク質のピークが、低分子量（20～40 kD）側に優位に位置していることが示されている。ついで、より大きな分解能を有するカラムを使用した。サンプル（250 µl）を、最適分離帯が70～3 kDの分子量にあるスーパーデックス・G75HR10/30（商標）排除カラム（ファーマシア・バイオテック社）に注入した。注入後15分間の待ち時間後（これはカラムのデッドボリュームよりわずかに少ないものに相当し、化合物が全く保持されない場合の安全マージンを残す、0.24 mlのデッドボリューム）、カラム流出物を96ウェルプレートに4℃で150 µl/ウェルの量で収集した。ポンプの排出量は0.5 ml/minで、検出波長は280 nmであった [シリーズ10ポンプ：パーキン・エルマー社（Perkin Elmer）、SP8450ディテクター：スペクトラ・フィジックス社（Spectra Physics）、LC1-100インテグレーター：パーキン・エルマー社、モデル201フラクションコレクター：ギルソン社（Gilson）]。種々の注入に対して得られたクロマトグラフィープロフィールは再現性があるが、得られたフラクションを「ウェルからウェル」で混合して、フラクション当たり約800 µlの作業容量にした。種々のフラクションを、冷蔵庫又は粉碎氷で冷却状態に保ち、酵素活性を保持させた。種々のフラクションに相当する分子量を、8～18%のアクリルアミド勾配を持つポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定した。サンプルを変性ラエミリ（Laemmli）バッファー（0.0625 Mのトリス、pH 6.8、2%のSDSを含有するがDTTを含有しない）で1/4に希釈し、ローディングを20 µlにした。ファーマシア・バイオテックのプロトコルに従って染色された硝酸銀 [キット：銀染色ブルソン（plusone）] により、タンパク質バンドを明視化した。

【0077】プロテアーゼ活性の分析：スーパーデックス・G75HR10/30排除カラムを通過させて得られたフラクションに含有されるプロテアーゼ活性をエンツェック（Enzcheck）（商標）キット [分子プローブ（Molecular Probes）] で蛍光定量法により分析した。このキットは、層分離や沈殿をさせることなく、迅速かつ簡単にプロテアーゼ活性を測定できる方法であり、異なったフラクションのプロテアーゼ活性を素早くスクリーニングするのに適している。このプロトコルでは、基質として、酵素消化後に蛍光発光するBODIPYfl-カゼイ



ン（商標）が使用される。このように発光した蛍光は、サンプルに含有されるプロテアーゼ活性に対して正比例関係にある。蛍光を、485nmの励起波長（2.5nmのスリット）、535nmの発光波長（8nmのスリット）及びウェル毎に1秒の積分時間で、LS50B分光蛍光計（パーキン・エルマー社）により測定した。5mMの最終濃度において、システインの存在下又は不在下で分析を行い、可能なシステインプロテアーゼ活性を抽出した。結果を図1に示す。

【0078】プロテアーゼプロフィールには、バッファ10ーがシステインを含有する場合には存在するが、バッファーがシステインを含有しない場合には存在しないピーク

0.1Mのアセテートバッファ、pH4.0～5.75

0.1Mのホスファートバッファ、pH5.75～8.25

全てのバッファには、5mMのEDTA及び0.1%のトリトンX100を含んでいる。活性を0.25pH単位毎に測定した。プロテアーゼ活性を測定する前述の方法を、各フラクションにおける2つのバッファの各々においても使用した。結果を図2に示す。基質であるBODIPYFL-カゼイン（商標）に作用する、角化層から抽出されたプロテアーゼの最適pHは、4.0～6.25の酸性側pH値に位置している。

【0080】最も高い活性は、アセテートバッファのpH5.0～5.5の間で得られた。よって、pH5.0のアセテートバッファを残りの実験に使用した。

【0081】阻害剤の使用によるプロテアーゼピークの特異性：上で単離されたシステイン依存プロテアーゼをより良好に特徴付けるために、公知のプロテアーゼ阻害剤による阻害テストを行った。考慮される阻害剤の存在又は不在（対照体）下であって、最終濃度が5mMのシステインの存在下で、先の測定と同様の方法で測定を行った。

【0082】インヒビターE64：E64は、システインプロテアーゼ、特にカテブシンB、H、Lの阻害剤である〔タンパク分解酵素：実用的アプローチ、アール・ジェイ・ベイトン（R.J. Benton）及びジェイ・エス・ボンド（J.S. Bond）、IRLプレス、オックスフォード、1989年〕。

【0083】テストを1.4μMのME64インヒビター濃度で行った。結果を図3に示す。1.4μMでのE64はG4ピークのシステイン依存プロテアーゼの活性を約71%阻害した。この阻害剤の特異性を考慮すると、G4はカテブシンB、H又はLである。

【0084】ロイペプチン：使用した用量において、ロイペプチンは、カテブシンB又はLに対して特異的であるが、カテブシンHには影響を及ぼさない〔シュワルツ（Schwartz）ら、1980年〕。1μMのロイペプチン濃度でテストを行った。結果を図4に示す。1μMでのロイペプチンは、システインの存在下で、G4のプロテアーゼ活性を約41%減少させた。G4はカテブシンH

\*ク（G4）の存在が示されている。よってこのピークは、システイン依存プロテアーゼの存在をフラクション34ないし47において現している。このプロテアーゼは28kDオーダーの分子量を有する。

【0079】プロテアーゼ活性の最適pH：G4ピークのプロテアーゼ活性の最適pHを特徴付けるために、「生化学研究のためのデータ（Data for Biochemical Research）」〔ドゥソン（Dawson）ら、第3版、オックスフォードサイエンス出版、1990年〕に記載されているような2つのバッファを4.0～8.25の範囲のpHをカバーするように調製した：

ではない。

【0085】キモスタチン：キモスタチンはカテブシンLに対して特異的であり、使用した濃度ではカテブシンBに対して不活性である〔イヌブシ（Inubushi）ら、「J. of Biochemistry」、第116巻、282～284頁、1994年〕。テストを2.5μMのキモスタチン濃度で行った。結果を図5に示す。2.5μMで使用すると、キモスタチンはG4ピークのシステイン依存プロテアーゼの50%以上を阻害した。G4はカテブシンL型プロテアーゼである。

【0086】インヒビターCA074：インヒビターCA074はカテブシンBに特異的であるが、カテブシンLには作用しない（イヌブシら、1994年）。1μMのインヒビターCA074濃度でテストを行った。結果を図6に示す。インヒビターCA074は、G4ピークのシステイン依存プロテアーゼの活性に特に影響を及ぼさなかった。G4はカテブシンB型のプロテアーゼではない。

【0087】ベプスタチン：ベプスタチンはアスパラギン酸プロテアーゼに特異的な阻害剤である〔タンパク分解酵素：実用的アプローチ、アール・ジェイ・ベイトン及びジェイ・エス・ボンド、IRLプレス、オックスフォード、1989年〕。

【0088】1μMのベプスタチン濃度でテストを行った。結果を図7に示す。ベプスタチンはG4に作用しない。G4はアスパラギン酸プロテアーゼではない。

【0089】G4の特異性を確認するためのLカテブシンに特異的な基質の使用〔Z（フェニルアラニン-アルギニン・2R110）〔アスファルグマヒレイド（Asfalq-Machleidt）ら、1992年〕〕：異なる阻害剤テストにより得られたG4の同定結果を、ローダミン110でラベルされたLカテブシンの好ましいベプチド基質を使用することによりチェックした。この基質は、カテブシンBよりも、カテブシンLの作用に対して850倍以上も敏感である。システイン除去なしの対照体、システイン存在下におけるプロテアーゼ活性の評価結果を

図8に示す。結果から、特異的なペプチド基質の強い加水分解が、カゼインのものと完全に重なり、G4のカテプシンL性が確認されることが分かる。

【0090】G4の見かけの等電点の評価：「タンパク質の精製」（ジェイ・シー・ジャンソン及びエル・ライデン、VHC出版社、ニューヨーク、1989年）に記載されているクロマトフォーカシング法により次の条件下でこの評価を行った。

カラム：モノ（Mono）PTM・HR5/20・ファーマシア。

サンプル：pH9.3で、0.075Mのトリス/アセテートバッファー中で平衡化されたヒト角化層抽出物。

溶出バッファー：pH6.0で、10mlのポリバッファー96/アセテート、

pH6.0（「タンパク質の精製」：ジェイ・シー・ジャンソン及びエル・ライデン、VHC出版社、ニューヨーク、1989年）。

流量：1ml/min。

フラクション：注入から0.5ml、全体で48ml。

検出：pH5.0で0.1Mのアセテートバッファー、0.1%のトリトンX100、5mMのEDTA、5mMのシステイン中の10mMのZ（フェニルアラニン-アスパラギン）2R110上でのカテプシンL活性。10μlのフラクションと200μlの基質を37℃で2時間30分インキュベート。光電子増倍管を700V、励起：485/10nm、発光：520/10nmにセットした、モレキュラー・ダイナミックス（Molecular Dynamics）のバイオルミンTM（BioluminTM）で読解。結果を図9に示す。これらの結果は、6～9の間の見かけ等電点を示している。

【0091】落屑過程におけるG4の推定される役割の証明：角質デスモシンは、落屑中に退化する角質デスモソーム中の必須タンパク質である【セレ・ジー（Serre G.）ら、J. I. D.、1991年、第97（6）巻、1061-1072頁】。ムネロット・シー（Munerot C.）により開発された方法【DEAレポート、1996年、マルン・ラ・ヴァレ（Marne la Vallee）大学】に

従い、角化層から抽出された角質デスモシンでテストを行った。G4ピークのプロテアーゼの存在下又は不在下で、全角化層におけるインキュベート後の角質デスモシンでなされた免疫移動（immunotransfer）は、顕著なその分解を示している。角化層に存在するG4ピークのプロテアーゼは、角質デスモシンを分解する。

【0092】実施されたテストの全ての結果により、角質層から抽出されたポリペプチドは、28kDの見かけの分子量と6～9の等電点とを有するカテプシンL型のシステイン依存プロテアーゼであると結論することが可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 システインの存在下又は不在下における、角質層由来のタンパク質サンプルに含まれるプロテアーゼの活性を示す図である。

【図2】 pHの関数としてのG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

【図3】 インヒビターE64【タンパク分解酵素：「実用的アプローチ」、アール・ジェイ・ベイトン及びジェイ・エス・ボンド、IRLプレス、オックスフォード、1989年】の存在下におけるG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

【図4】 ロイペプチンの存在下におけるG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

【図5】 キモスタチンの存在下におけるG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

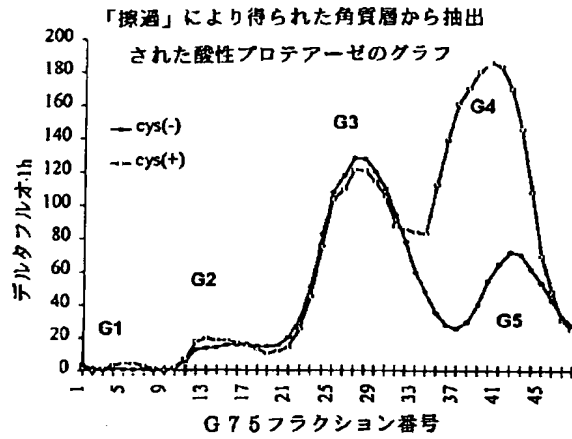
【図6】 インヒビターCA074【イヌブシラの「J. of Biochemistry」、第116巻、282-284頁、1994年】の存在下におけるG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

【図7】 ペプスタチンの存在下におけるG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

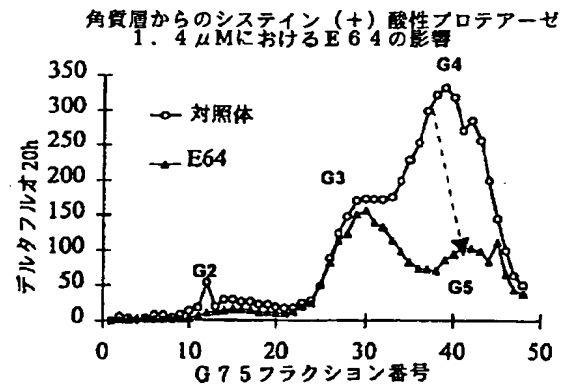
【図8】 カテプシンLの好ましいペプチド基質の存在下におけるG4ピークのプロテアーゼの活性を示す図である。

【図9】 見かけの等電点を決定するためのクロマトフォーカシング実験で得られた図である。

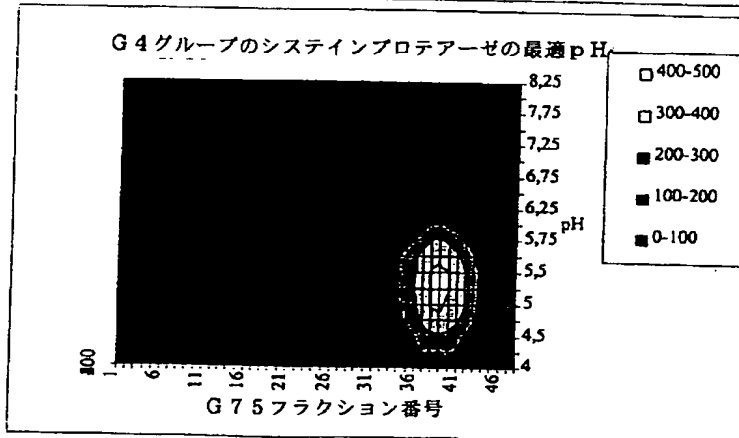
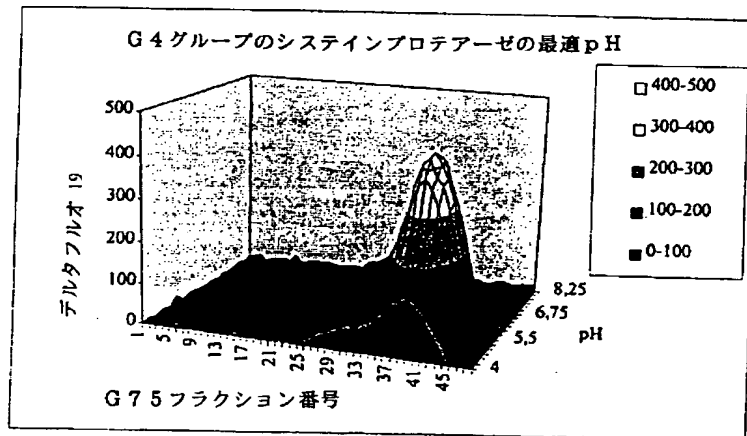
【図1】



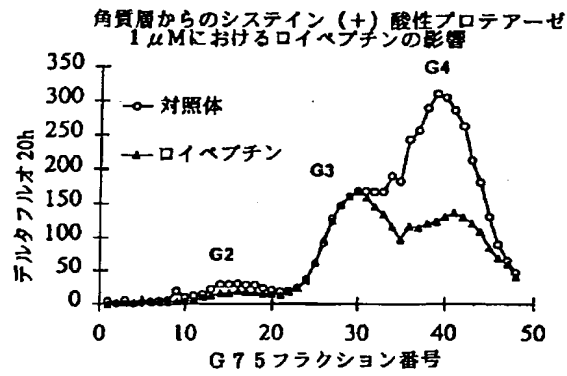
【図3】



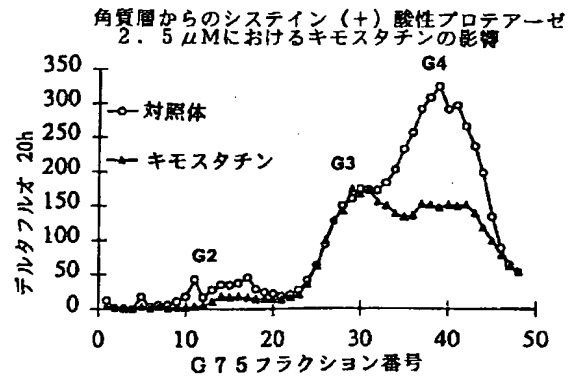
【図2】



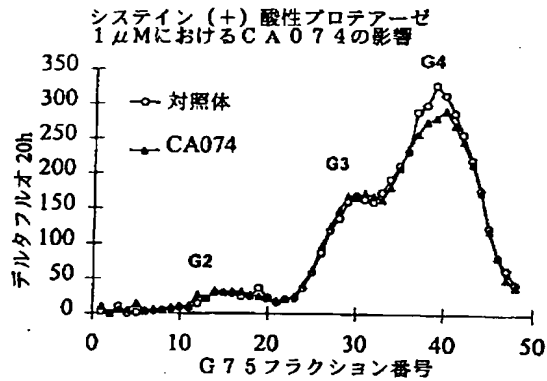
【図4】



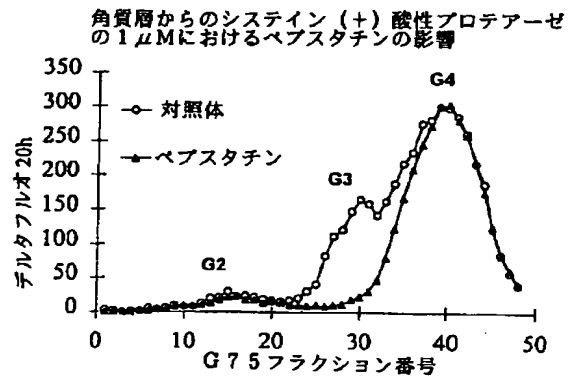
【図5】



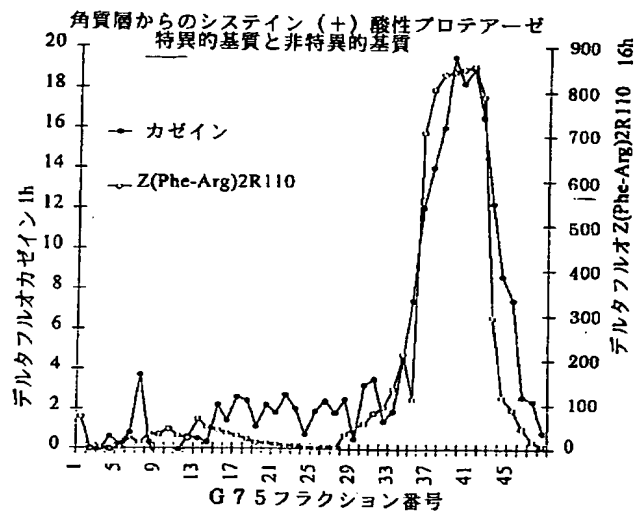
【図6】



【図7】

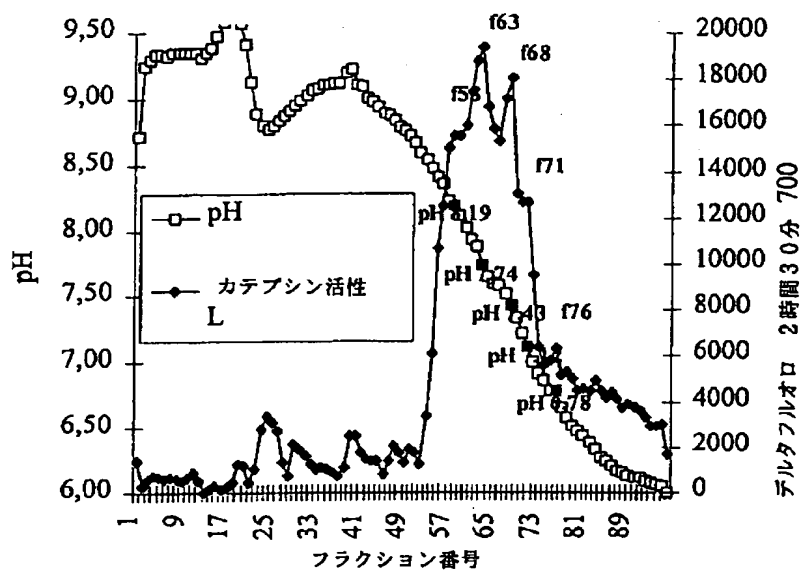


【図8】



【図9】

## CF4角質層抽出物クロマトフォーカシング



フロントページの続き

(72)発明者 マリーアリクス ベルナール・ブールブロン  
 フランス国 93130 ノアジー ル セク,  
 リュドゥ ラ ガール, 5